doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.04.17
J South Med Univ, 2016, 36(4): 544-547

临床研究

多发伤患者CD8$^+$CD28$^-$T细胞含量变化及其临床意义

麦惠强[1],许 进[2],蓝先旗[1],陈树鑫[1]
[1]中山市人民医院急诊科,广东 中山 528403;[2]广州市第一人民医院病理科,广东 广州 510180

摘要:目的 探讨多发伤患者CD8$^+$CD28$^-$T细胞含量变化及其与血小板(PLT)及D二聚体(D-D)的相关性。**方法** 收集26例多发伤患者作为观察对象,以31例单纯外伤患者(SI)及35名健康人作为对照组,采用流式细胞术检测首诊时外周血CD8$^+$CD28$^-$T细胞及其胞内转化生长因子β1(TGF-β1)及白介素10(IL-10)百分含量,并比较3组PLT及D-D含量差异;分别在多发伤患者伤后24、48及72 h重复检测上述5项指标并分析其相关性。**结果** (1)多发伤组患者CD8$^+$CD28$^-$T细胞、TGF-β1及IL-10均显著高于单纯外伤(SI)组及健康组(P<0.05),但后两组之间无统计学差异;(2)单纯外伤(SI)组及多发伤组患者PLT及D-D均显著高于健康组,3组间两两差异均具有显著性(P<0.05);(3)多发伤患者伤后48 h的CD8$^+$CD28$^-$T细胞、TGF-β1及IL-10均显著高于伤后24 h(P<0.05),但伤后72 h上述3项指标均较伤后48 h及24 h显著下降(P<0.05),伤后24、48及72 h PLT及D-D均呈下降趋势,任意两个时间点的变化均具有统计学差异(P<0.05);(4)CD8$^+$CD28$^-$T细胞、TGF-β1及IL-10这3者与PLT及D-D均呈显著正相关性(均为r>0.70,均为P<0.05)。**结论** 早期升高但伤后72 h回落是多发伤患者CD8$^+$CD28$^-$T细胞及其细胞因子的变化趋势,且这三者与凝血功能密切相关。
关键词:多发伤;CD8$^+$T细胞;细胞因子;血小板;D二聚体

Changes of CD8$^+$CD28$^-$ T cell percentage in patients with multiple injuries and their clinical significance

MAI Huiqiang[1], XU Jin[2], LAN Xianqi[1], CHEN Shuxin[1]
[1]Department of Emergency Medicine, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528403, China; [2]Department of Pathology, First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, China

Abstract: Objective To investigate the correlation of the changes in CD8$^+$CD28$^-$ T cell percentage with platelet (PLT) and D-dimer (D-D) levels in patients with multiple injuries (MI). **Methods** Twenty-six patients with MI, 31 with a single injury (SI group) and 26 healthy individuals were examined for peripheral blood CD8$^+$CD28$^-$ T cells and intracellular transformation growth factor-β1 (TGF-β1) and interleukin 10 (IL-10) contents using flow cytometry at 24, 48, and 72 h after the injuries. PLT and D-dimer levels were compared among the 3 groups. **Results** CD8$^+$CD28$^-$ T cells, TGF-β1 and IL-10 were significantly higher in MI group than in SI group and healthy control group (P<0.05) without significant differences between the latter 2 groups. The levels of PLT and D-D differed significantly among the 3 groups, the highest in MI group and the lowest in the control group. In MI group, CD8$^+$CD28$^-$ T cells, TGF-β1 and IL-10 significantly increased at 48 h after the injury (P<0.05) but decreased significantly at 72 h (P<0.05) compared with the measurements at 24 h. The levels of PLT and D-D trended to decrease with time after the injuries and showed significant differences among the 3 groups at any of the 3 time points (P<0.05). CD8$^+$CD28- T cells, TGF-β1 and IL-10 were all positively correlated with the levels of PLT and D-D in MI patients (r>0.70, P<0.05 for all comparisons). **Conclusion** In MI patients, CD8$^+$CD28$^-$ T cell percentage and their cytokines tend to increase early after the injury but decrease significantly at 72 h in close relation with the changes of the coagulation function following the injuries.
Key words: multiple trauma; CD8$^+$ T cells; cytokines; platelets; D-dimmer

多发伤(MI)是急诊外科的常见病种之一,由于MI导致生命征不平稳而直接影响生命[1-2],故MI的病理生理学改变应得到充分的认识。研究表明[2],免疫功能失调在MI早期即发挥重要角色,如CD4$^+$CD25$^+$调节性T细胞(Treg)表达含量增多。此外,MI可导致包含血小板(PLT)[3]及D二聚体(D-D)[4]在内的凝血功能障碍,从而形成恶性循环。同样作为Treg的一种,CD8$^+$CD28$^-$T细胞在MI起到何种作用,与凝血功能关系如何?目前尚缺少研究。以此为创新点,本研究观察了MI患者不同时间点CD8$^+$CD28$^-$Treg及其细胞因子的变化,并发现其与血小板及D-D呈显著相关性。

收稿日期:2015-12-13
基金项目:中山市科技计划项目(2014A1FC145)
作者简介:麦惠强,副主任医师,E-mail: 1516963310@qq.com

1 资料和方法

1.1 研究对象

以2011年1月~2015年1月期间我科收治的MI患

者作为观察对象,入选条件如下:同一外力因素导致2个及以上系统受损,具体诊断参照1994年年首届全国多发伤学术会议标准[5];伤前无合并肿瘤或免疫性疾病;近期无使用激素、免疫抑制剂或生物制剂[6]。共入选26例MI患者,其中男性23例,女性3例,年龄17~58岁,中位年龄45岁;车祸伤19例,殴打伤5例,高处坠落伤2例;胸腹联合伤13例,头胸及四肢伤11例,骨折合并内脏损伤9例。受伤至到诊时间差为20 min~1.5 h。以同期就诊的31例单纯外伤(SI)患者为阳性对照组,男26例,女5例,年龄20~63岁,中位年龄42岁;以同期到院查体的35名健康体检者为阴性对照组,男28例,女7例,年龄17~70岁,平均年龄47岁。以上3组的性别比例及年龄均无统计学差异(P>0.05)。

1.2 流式细胞术检测

在MI患者被送到急诊外科、伤后24 h、伤后48 h及伤后72 h共4个时间点分别采集其静脉血5 mL,使用免疫磁珠法分离出$CD8^+CD28^-$T细胞。使用固定穿透剂对胞内细胞因子TGF-β1及IL-10进行染色,使用BD公司生产的流式细胞仪的双激光光源,以CD8及CD28进行设门,进行$CD8^+CD28^-$T细胞、TGF-β1及IL-10的检测,每管获取细胞数1000个。运用FACSDIVA软件分析对3者的百分含量进行[7]。单纯外伤组患者在急诊就诊即刻采集静脉血。健康组在清晨空腹时采集静脉血,均按照上述方法检测。

1.3 凝血功能相关性检测

比较上述3组研究对象血小板计数及D-D含量,且MI组患者分别在伤后24、48及72 h均进行血小板及D-D含量比较[8]。

1.4 统计学方法

定量资料采用均数±标准差表示,采用方差分析LSD法进行3组间的两两比较,指标间的相关性分析采用Pearson参数法。使用统计软件包SPSS 17.0处理数据,当P<0.05认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组研究对象$CD8^+CD28^-$T细胞、血小板及D二聚体比较

与健康组比较,单纯外伤及MI组患者$CD8^+CD28^-$T细胞、TGF-β1及IL-10均升高,但单纯外伤组与健康组上述3者无统计学差异,但MI组3者显著高于另外两组(均为P<0.05)。单纯外伤及MI组患者血小板及D二聚体均显著高于健康组,3组间的两两差异均具有显著性(均为P<0.05,表1)。

表1 3组$CD8^+CD28^-$T细胞、血小板及D二聚体含量比较

Tab.1 Percentages of $CD8^+CD28^-$ T lymphocytes, platelets and D-dimer in the 3 groups (*Mean±SD*)

Groups	*n*	$CD8^+CD28^-$T cells (%)	TGF-β1 (%)	IL-10 (%)	PLT (G/L)	D-Dimer (mg/L)
MI	26	5.28±3.19*#	4.36±2.07*#	4.79±2.18*#	431.48±226.19*#	8.29±6.12*#
SI	31	3.02±1.37	2.75±1.24	2.91±1.37	316.64±159.27#	4.13±3.04#
Control	35	2.74±1.23	2.49±1.13	2.63±1.25	223.81±104.93*	1.48±0.93*
F		2.893	2.571	2.704	19.823	4.012
P		0.013	0.032	0.021	0.000	0.003

MI: Multiple injury group; SI: Single injury group; PLT: Platelet. *P<0.05 *vs* single injury group; #P<0.05 *vs* healthy group.

2.2 多发伤患者$CD8^+CD28^-$T细胞、血小板及D二聚体变化特点

有1例MI患者在伤后第15小时死亡(失血性休克),1例在伤后39 h死亡(脑疝),2例在伤后48~72 h死亡(1例为脓毒症,另1例为呼吸衰竭)。伤后48 h,MI患者$CD8^+CD28^-$T细胞、TGF-β1及IL-10均显著高于伤后24 h(均为P<0.05);但伤后72 h上述3项指标均较伤后48 h及24 h显著下降(均为P<0.05)。伤后24、48及72 h血小板及D二聚体均呈下降趋势,任意两个时间点的变化均具有统计学差异(均为P<0.05)。

2.3 相关性分析

MI患者急诊首次检测$CD8^+CD28^-$T细胞、TGF-β1及IL-10这3者含量与血小板及D二聚体两者均呈显著正相关性(所得相关系数r均大于0.70,P均小于0.05),其中相关性最强为$CD8^+CD28^-$T细胞与血小板(P=0.000)。

3 讨论

免疫功能改变在疾病的发生发展过程中的重要作用已经得到各个专业领域学者的重视,包括内科疾病及外伤等外科疾病。研究表明[9-10],在创伤早期即可引起免疫功能的异常,导致免疫细胞池的重新分布,这当中不同功能的免疫细胞如T细胞会募集到相应的损受损部位,从而对外伤导致的病理生理学产生影响,最终导

表2 MI患者不同时间点CD8⁺CD28⁻T细胞、血小板及D二聚体含量变化

Tab.2 Percentages of CD8⁺CD28⁻ T lymphocytes, platelets and D-dimer at different time points following MI (*Mean*±*SD*)

Time points after injuries	*n*	CD8⁺CD28⁻T cells (%)	TGF-β1 (%)	IL-10 (%)	PLT (G/L)	D-Dimer (mg/L)
24 h	25	5.41±3.27#	4.59±2.28#	5.03±2.39#	441.27±238.22#	9.27±6.93#
48 h	24	6.92±4.39*	5.43±2.42*	6.21±3.78*	394.32±215.93*	6.24±5.07*
72 h	22	4.18±2.78*#	3.01±1.25*#	4.03±2.54*#	305.18±173.32*#	4.13±2.47*#
F		-3.383	-3.274	-3.012	14.297	4.734
P		0.011	0.023	0.031	0.001	0.006

PLT: Platelets. *P<0.05 *vs* 12 h after injury; #P<0.05 *vs* 24 h after injury.

表3 CD8⁺CD28⁻T细胞与血小板及D二聚体的相关性分析

Tab.3 Correlation analysis of CD8⁺CD28⁻ T lymphocytes with platelets and D-dimer in patients with MI

Indexes	CD8⁺CD28⁻T cells		TGF-β1		IL-10	
	r	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*
PLT	0.864	0.000	0.791	0.003	0.816	0.000
D-Dimer	0.764	0.012	0.779	0.016	0.725	0.023

PLT: Platelets.

致不同的疾病结局。T细胞可分为CD4⁺辅助性(Th)及CD8⁺杀伤性(Tc)两大亚群，严重多发伤后患者免疫功能受到明显抑制，且CD4⁺/CD8⁺亚群的比值可以作为严重多发伤患者预后的一个评价指标，这初步说明此两群细胞的重要性[11-12]。Th包括了CD4⁺CD25⁺Treg及分泌白介素17的Th17细胞等，其中CD4⁺CD25⁺Treg与严重多发伤患者免疫功能抑制密切相关，它们能抑制性调节CD4⁺和CD8⁺T细胞的活化与增殖，达到免疫的负调节作用[13]。而Tc包括了CD8⁺CD28⁺及CD8⁺CD28⁻两大群T细胞，后者由于具有免疫增强及免疫抑制双重功能，因此被归属到Treg亚群[14]。近年研究表明[15]，缺乏CD28⁺表达的CD8⁺CD28⁻细胞同CD4⁺CD25⁺Tregs一样，具有免疫抑制活性，也是Tregs中的一个重群体，它们既能抑制T细胞增殖又能抑制其细胞毒性。因此，CD8⁺CD28⁻与CD4⁺CD25⁺Tregs可能协同加重严重创伤患者的免疫抑制。Treg细胞有一个共同特点，即分泌细胞因子TGF-β1及IL-10从而实现免疫调节，故此两种细胞因子往往可反映细胞功能而常被检测[16]。

有学者[2]在MI患者伤后1、3、5、8 d用流式细胞仪检测各组患者外周血CD4⁺CD25⁺Treg，发现伤后5 d Treg细胞比率开始升高，从而认为CD4⁺CD25⁺Treg在严重创伤后的免疫抑制中扮演着重要的角色，Treg细胞比率的变化有助于评估患者的预后及判断并发脓毒症的危险度。还有学者发现[17-18]，严重多发伤患者早期即有CD4⁺CD25⁺Treg比例的显著升高，且认为检测CD4⁺CD25⁺Treg的水平对于评估严重多发伤患者的细胞免疫状态，预测继发感染均有很大的帮助。此外，凝血功能的异常被认为是MI的另一个重要病理生理学改变。有研究发现[19]，血小板数(PC)/白细胞数(WBC)比值(PC/WBC)在MI患者伤后第1、3、7天均呈现显著性变化，提示PC/WBC比值可作为多发伤患者的预后判断指标。还有学者发现[20]，MI患者出现死亡组的DD水平显著高于生存组，且其并发多器官功能障碍综合征(MODS)几率同样显著高于非并发MODS组。以上研究凸显Treg在MI病情进展的重要作用，也提示凝血功能障碍在MI的作用。但CD8⁺CD28⁻Treg与MI的关系如何，其与凝血功能障碍关系如何？目前尚未见探讨，这对于深化MI的免疫学特征研究是不利的。

本研究发现，MI组患者CD8⁺CD28⁻T细胞、TGF-β1及IL-10均显著高于单纯外伤组及健康组；但后两组之间无统计学差异，这初步说明CD8⁺CD28⁻T细胞、TGF-β1及IL-10这3者的同步升高对于MI而言具有特异性，对于单纯外伤而言无特异性，间接提示3者与受伤程度及生命体征是否平稳相关。在凝血功能方面，本研究发现，单纯外伤及多发伤组患者血小板及D二聚体均显著高于健康组，3组间的两两差异均具有显著性，这说明不论是否属于MI，伤后均有不同程度的凝血功能异常，表现为高凝状态，但这种状态没有特异性，同时说明，血小板及D-D的特异性不如CD8⁺CD28⁻T细胞、TGF-β1及IL-10这3者。在动态演变方面，伤后48 h MI患者CD8⁺CD28⁻T细胞、TGF-β1及IL-10均显著高于伤后24 h，但伤后72 h上述3项指标均较伤后48 h及24 h显

著下降，提示伤后48 h可能是CD8+CD28-T细胞含量及其分泌TGF-β1及IL-10的高峰期，此含量随后显著下降，可能是免疫抑制过度需求增加导致消耗增多所致。在凝血功能指标的演变方面，伤后24、48及72 h血小板及D二聚体均呈下降趋势，任意两个时间点的变化均具有统计学差异，提示伤后由于大部分患者出现失血，甚至失血性休克，导致血小板消耗过多，体内处于低凝状态，故血小板及D-D降低。相关性分析显示，CD8+CD28-T细胞、TGF-β1及IL-10这3者与血小板及D二聚体两者均呈显著正相关性，这进一步提示了，在创伤早期，CD8+CD28-T细胞及其细胞因子升高与高凝状态是平行的，其机制是保护体内的过度失血状态，对机体可能是有利的因素。

本研究认为，早期升高、伤后72 h回落是多发伤患者CD8+CD28-T细胞及其细胞因子的变化趋势，且3者与凝血功能受损及出血倾向有关。本研究的不足包括观察例数较少，观察周期较短，将在后续的研究加以改进。

参考文献：

[1] 张丽娜, 吴铁军, 张保军, 等. 严重多发伤患者Th17细胞的变化特点及其与继发脓毒症的关系[J]. 中国急救医学, 2012, 32(6): 502-5.

[2] 程纪群, 唐朝晖, 白祥军, 等. 严重多发伤患者伤后调节性T细胞的变化及其与损伤严重度和脓毒症的关系[J]. 中华创伤杂志, 2009, 25(7): 634-7.

[3] 鲁 力, 胡 平, 文玉明, 等. 严重多发伤并发继发性血小板增多症的临床分析[J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24(5): 493-7.

[4] 李天星, 李伟荣, 蔡婷婷. 多发伤患者早期凝血功能与预后相关因素探讨[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 3(23): 283-5.

[5] 首届全国多发伤学术会议纪要[J]. 中华创伤杂志, 1994, 10(1): 33.

[6] 王 宇, 刘欣伟, 王俊杰, 等. 多发伤后早期T细胞亚群的变化及其临床意义[J]. 大连医科大学学报, 2011, 33(3): 243-7.

[7] Li M, Lin YP, Chen JL, et al. Role of regulatory T cell in clinical outcome of traumatic brain injury[J]. Chin Med J, 2015, 128(8): 1072-8.

[8] 周泽强, 邓 哲, 王卫东, 等. 多发伤早期组织因子及组织因子途径抑制物-1的变化及其意义[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(12): 2501-3.

[9] 陈国兵, 杨利荣, 唐朝晖, 等. 严重多发伤患者外周血自然杀伤性T细胞的变化及意义[J]. 创伤外科杂志, 2009, 11(6): 548-51.

[10] Bergmann CB, Hefele F, Unger M, et al. Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model[J]. Immunol Res, 2016, 64(2): 508-17.

[11] 郑琦涵, 岳茂兴, 李 瑛. 早期严重多发伤患者全血CD3+,CD4+,CD8+的变化[J]. 世界急危重病医学杂志, 2007, 4(6): 2136-7.

[12] Notley CA, Mccann FE, Inglis JJ, et al. ANTI-CD3 therapy expands the numbers of CD4+ and CD8+ Treg cells and induces sustained amelioration of collagen-induced arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(1): 171-8.

[13] 唐朝晖, 余 彦, 白祥军, 等. 严重多发伤患者外周血CD4+CD25high调节性T细胞的变化及意义[J]. 中华创伤杂志, 2008, 24(2): 92-5.

[14] Eusebio M, Kraszula L, Kupczyk M, et al. The effects of interleukin-10 or TGF-beta on anti-CD3/CD28 induced activation of CD8+CD28-and CD8+CD28+T cells in allergic asthma[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2013, 27(3): 681-92.

[15] Filaci G, Fenoglio D, Fravega M, et al. CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers[J]. J Immunol, 2007, 179(7): 4323-34.

[16] 秦光明, 施小燕, 吴定钱. 多发伤患者外周血T淋巴细胞亚群与炎症的相关性研究[J]. 中华创伤杂志, 2007, 23(6): 449-50.

[17] 张丽娜, 吴铁军, 田 辉. 严重多发伤患者外周血中CD4+CD 25+调节T细胞的变化特点[J]. 临床急诊杂志, 2008, 9(5): 275-8.

[18] Wang Z, Yang XR, Song H, et al. Immune function alterations during 12 weeks of abstinence in heroin users[J]. Folia Biol (Praha), 2015, 61(6): 241-6.

[19] 姜旭霞. 血小板数与白细胞数的比值在多发伤患者预后中的价值探讨[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(3): 295-6.

[20] 高金丹, 陈国锋. 多发伤患者血浆D-二聚体的检测及临床意义[J]. 中外医疗, 2010, 29(15): 50.

（编辑：经 媛）